

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2004年10月21日(21.10.2004)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2004/089430 A1

- (51) 国际分类号: A61L 15/18, A61K 33/00, A61P 43/00
(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000265
(22) 国际申请日: 2004年3月26日(26.03.2004)
(25) 申请语言: 中文
(26) 公布语言: 中文
(30) 优先权:
03109623.9 2003年4月9日(09.04.2003) CN
(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 江苏阳生生物工程有限公司(JIANGSU YENSSEN BIOTECH CO., LTD) [CN/CN]; 中国江苏省江阴市滨江开发区定山路10号, Jiangsu 214431 (CN).
(72) 发明人及
(75) 发明人/申请人(仅对美国): 周来生(ZHOU, Laisheng) [CN/CN]; 中国江苏省江阴市滨江开发区定山路10号, Jiangsu 214431 (CN).
(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市阜成门外大街2号万通新世界广场8层, Beijing 100037 (CN).
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: NEW DRESSING MATERIAL PROMOTING RECOVERY OF SKIN WOUND

(54) 发明名称: 促进皮肤创面快速修复的新型敷料材料

(57) Abstract: This invention discloses a new kind of dressing material and an application of the dressing material in skin wound treatment. The dressing material can promote proliferation of the epithelial cells. The material comprises inorganic Si and Ca as active components that are useful for actively inducing proliferation and differentiation of huminine epithelial cells, inhibiting inflammatory effusion, promoting recovery of skin wound. The material, in forms of powder, ointment or sticking, can be used for a large scale chronic skin wound treatment of cutting, contusion, burns, scald, chemical burns, bedsores and various skin ulcer etc safely, economically and effectively.

(57) 摘要

公开了一种可促进上皮细胞增殖的新型敷料材料及其在皮肤创面治疗中的应用。该材料以能主动诱导人体皮肤上皮细胞增殖分化、抑制创面炎性渗出、促进皮肤创面快速愈合的硅和钙无机元素为生物活性物质, 以散剂剂型、软膏剂型和贴胶剂型, 可安全、经济、有效地用于因切割伤、挫伤、烧伤、烫伤、化学性灼伤、褥疮和各类皮肤表面溃疡等慢性大面积皮肤创面治疗。

促进皮肤创面快速修复的新型敷料材料

技术领域

本发明涉及一类新型的可促进上皮细胞增殖的敷料材料，无机元素硅和/或钙在制备这样的敷料材料中的用途，以及体外促进上皮细胞增殖的方法。

背景技术

人体表面皮肤的各种创伤是生活中难以避免的常见症状，常见为各种日常的切割伤，挫伤，烧伤，和化学性灼伤等。伤口的愈合拖得越久，愈合后的疤痕也越不容易消失。对褥疮和糖尿病患者的各类皮肤表面溃疡等慢性大面积皮肤创面则更需表面上皮的快速生长修复。因此，对各类皮肤创伤的理想治疗指标是控制继发性细菌感染和促进伤口快速愈合。

现有技术中，各类抗菌素软膏、霜剂或粉剂被广泛用于人体表面创伤的外用敷料。但是，单一的或复合的抗菌素外用敷料仅能用于控制创面的继发性细菌感染，而不具有主动诱导皮肤上皮细胞在创面上快速生长导致创面快速愈合的生物作用。美国专利 6262020 公开了一种以透明质酸为主的外用药配方，以控制皮肤创面的炎性反应。美国专利 5190917 和 5290762 公开了丝氨酸酶抑制剂具有的抗炎作用，美国专利 6262020 并将此抑制剂加入创面外用药中来抑制创面的炎性反应。但是，上述专利公开的外用敷药均不具有主动诱导和促进创面上皮生长的作用。美国专利 5604200 公开了一种加入血浆纤维结合蛋白 (plasma fibronectin) 的外用创面敷料。但是，尽管此类纤维结合蛋白在理论上具有促进人体细胞的附着作用，在实际应用中，如从人体血浆中提取此类蛋白，则来源有限，价格昂贵，故难以在临幊上实施；如以体

外基因工程途径获取此类蛋白，则基因合成的蛋白不具有与人体自然蛋白相似的生物活性。此外，无论是自然或基因合成的蛋白，均不易消毒且易引起人体的超敏反应，蛋白质的稳定性难以在生产、库存、运输、销售、及临床上的各种不同环境中得以保持。所以，以生物活性蛋白作为常用外用药有效成分的理论并不具有临床的实用价值。

因此，现有技术中迫切需要一种可诱导上皮细胞增殖和创面修复，并拥有足够生物稳定性的敷料材料。

发明内容

本发明是基于本发明人对寻求一种兼有主动诱导人体皮肤创面上皮细胞再生，消除炎症，主动促进人体皮肤创面快速愈合的外用生物材料的长期且深入的研究，并直接基于本发明人的首创发现。

按以往的传统概念，所有无机元素材料均为“惰性”材料，即无机元素材料不具有激发生物细胞生长的诱导作用。

本发明人开创性地发现，一些无机元素材料同样能作为一种化学信号，能选择性地激发和调节细胞的生长和分化。

具体地说，本发明人发现，无机元素硅和/或钙微颗粒具有主动诱导人体上皮细胞增殖、分化、移行的生物诱导特性和中和创面酸碱度的抗炎特性，在诱导上皮伤口愈合和防止继发性细菌感染具有很好的效果。

在本发明的一个方面，本发明提供了一种可用于治疗或缓解需要促进上皮细胞增殖分化的疾病或状况的敷料材料，其中含有有效剂量的无机元素硅和/或钙微颗粒以及任选地医学上可接受的载体和/或赋形剂。这样的敷料材料能主动地诱导上皮细胞增生，促进伤口快速愈合。

在另一方面，本发明还涉及无机元素硅和/或钙在制备可用于治疗或缓解需要促进上皮细胞增殖分化的疾病或状况的敷料材料中的用途。

本发明最后提供了一种体外促进上皮细胞增殖的方法，包括对这样的细胞施用有效量的硅和/或钙微颗粒物质。

附图说明

图 1. 是硅、钙微颗粒敷料材料的电子扫描显微镜照片。

图 2. 显示了正常人上皮细胞在硅和钙微颗粒诱导下的细胞培养照片。

图 3. 显示了不同浓度下，硅、钙微颗粒及其组合对正常人上皮细胞的增殖的促进作用。其中图 3a 显示了暴露于硅、钙元素 12 天后，上皮细胞的增殖倍数，图 3b 显示了暴露于硅、钙元素 20 天后，上皮细胞的增殖倍数。

图 4. 显示了不同浓度下，硅、钙微颗粒及其组合对正常人上皮细胞中第 4 型纤维蛋白的合成与分泌的诱导作用。其中图 4a 显示了暴露于硅、钙元素 12 天后上皮细胞中第 4 型纤维蛋白的含量，图 4b 显示了暴露于硅、钙元素 20 天后上皮细胞中第 4 型纤维蛋白的含量。

图 5. 显示了不同浓度下，硅、钙微颗粒及其组合对正常人上皮细胞中上皮生长因子的合成与分泌的诱导作用。其中图 5a 显示了暴露于硅、钙元素 12 天后上皮细胞中上皮生长因子的含量，图 5b 显示了暴露于硅、钙元素 20 天后上皮细胞中上皮生长因子的含量。

图 6. 硅、钙微颗粒敷料材料用于临床病例的治疗过程照片。

具体实施方式

在一个实施方案中，本发明提供了一种可用于治疗或缓解需要促进上皮细胞增殖分化的疾病或状况的敷料材料，其中含有有效剂量的无机元素硅和/或钙微颗粒以及任选地医学上可接受的载体和/或赋形剂。在本发明的敷料材料中，无机元素硅和/或钙微颗粒的成分的含量可以广泛地变化或调整，按组合物重量计，例如 0 - 100%，优选为 0.5% - 90%。

在本发明的敷料材料中，所述无机元素硅可以是任何无机物质形式，包括例如 SiO_2 、 NaAlSiO_2 、 KAISiO_2 等的形式，或者是这样的化合物的任意混合物形式。所述无机元素钙也可以是任何无机钙物质形式，包括例如 CaO 、 CaSO_4 、 CaPO_4 、 CaCl_2 等的形式，或者是这样的化合物的任意混合物形式。

本发明人首次证明和采用无机元素“硅”为诱导人体皮肤上皮细胞增殖分化的主要化学成分。如附图（见下文）的正常人上皮细胞的实验数据证明，添加入细胞培养液中的硅对上皮细胞的增殖（附图 3）、第 4 型胶原纤维蛋白合成与分泌（附图 4）、及上皮生长因子合成与分泌（附图 5）等上皮细胞增殖和分化的关键生物指标具有明显（1 - 6 倍）的诱导促进作用。因此，本发明将无机元素“硅”定为诱导人体皮肤上皮细胞增殖分化的主要化学物质。

本发明人还首次证明和采用无机元素钙作为诱导上皮细胞增殖分化以及中和皮肤创面酸性产物的化学成分。如附图 3、附图 4 和附图 5（见下文）的实验数据证明，添加入细胞培养液中的钙对上皮细胞的增殖（附图 3）、第 4 型胶原纤维蛋白合成与分泌（附图 4）、及上皮生长因子合成与分泌（附图 5）等上皮细胞增殖和分化的关键生物指标具有（1-2 倍）诱导促进作用。因此，本发明将无机元素“钙”定为诱导人体皮肤上皮细胞增殖分化的另一有效化学物质。

在本发明的敷料材料中，无机元素硅和钙既可单独应用，又可组合使用。本发明人首次证明，在已添加了硅的细胞培养液中再添加钙，可使上皮细胞的增殖（附图 3）和第 4 型胶原纤维蛋白（附图 4）及上皮生长因子（附图 5）的合成及分泌指标上升 6-7 倍，显示出明显的协同诱导促进作用。

在本发明中，除非另有说明，硅和钙两种元素均可被单一的用作诱导人体皮肤上皮细胞增殖分化的化学物质，以有效地主动诱导新生骨组织形成。

因此，除非另有说明，本发明确定：硅和钙两种元素又能合并使用，形成“有效生物诱导活性物质的元素组合”，其化学原子量组合比例定为，硅为 0%-100%，钙为 100%-0%。本发明还确定优选的具有最佳诱导作用的“有效生物诱导活性物质的元素组合”，按照化学原子量的百分比例，硅为 50%-100%。钙为 0%-50%。

本发明人还首次证明，附图 3、附图 4 和附图 5 的各项实验数据显示，硅与钙的添加浓度与其生物诱导作用呈正比，在硅生理浓度饱和点（100 ppm）和钙生理浓度（33 ppm）时生物诱导作用达到最高值。据此，本发明将皮肤敷料的有效生物诱导活性物质各类元素的浓度定为，硅的浓度为能使伤口创面组织的硅浓度上升至 1 ppm - 100 ppm，钙的浓度为能使伤口创面组织的钙浓度上升至 1 ppm - 33 ppm。

文中使用的术语“个体”是指动物，特别是哺乳动物（如猿、牛、马、猪、绵羊、啮齿动物、山羊、狗、猫、兔），且最好是人。

此生物活性材料中的硅和钙微颗粒可以为各种单元素微颗粒，两种元素微颗粒的组合，或以各种单种元素混合后通过常规的物理或化学途径干化研磨所得复合元素微颗粒。图 1 中显示了本发明硅、钙微颗粒敷料材料的电子扫描显微镜照片。

在本发明中，对于实现发明目的，各种单种元素微颗粒混合或复合元素微颗粒内的组合原子量比例并不是关键，因为不同比例的原子量比或重量比均分布于此两个元素的有效诱导作用范围内，所不同的仅是诱导活性的大小。因此，可使用以无机元素硅为主要生物诱导活性物质和以无机元素钙为单一或协同生物诱导活性物质的两种无机元素的各种原子量或重量比例的组合为本发明人体皮肤创面敷料的生物活性物质。

本发明中的硅和钙微颗粒直径可采用混合型的形态组合（图1），硅和钙微颗粒的直径设定为大于100纳米和小于100微米之范围。其中，小型的微颗粒（小于1000纳米的微颗粒）有利于在与细胞或皮肤创面接触的瞬间即发挥其生物诱导作用，较大型的微颗粒（大于1000纳米和小于100微米）则在与细胞或皮肤创面接触后逐渐溶解释放而起到迟缓和较长久的生物诱导作用。如此的大小型微颗粒混合使用可既获得立即的创面上皮细胞的诱导作用，又可保持上皮细胞的持续增殖和分化，保证了敷料对创面的持续的有效诱导作用。应该说明的是，本发明中材料的微颗粒大小仅涉及该材料生物诱导作用的时速快慢和长短，并不直接改变本发明设定的硅钙材料的生物诱导活性。因此，本发明中设定的硅和钙颗粒的直径定为任何直径的可溶解性颗粒，其中硅和钙微颗粒直径最优先设定为大于100纳米和小于100微米之范围。

无机元素硅和钙在本发明中被设定为能诱导人体皮肤组织增殖、分化及修复的生物活性元素，这亦是生物材料学领域的一项突破。现有技术中，合成或提取之外源性胶原纤维蛋白、上皮生长因子、或各类连接蛋白等被认为具有上皮诱导作用，此类生物蛋白制品具有安全性差、生物活性稳定性差、成本昂贵等缺点，难以应用于生物工程技术和临床实施。根据本发明的附图3、附图4和附图5中的各项实验数据以及附图6所示的人体皮肤创面

临床实施病例，无机元素硅和钙单一使用或组合使用被首次证明能取代生物活性蛋白，起到对上皮细胞的生物诱导作用和明显地促进皮肤创面快速愈合。以此组无机元素作为人体皮肤创面敷料的主要活性材料，能使皮肤创面敷料变得安全、稳定、取材方便、成本低，明显提高皮肤创面敷料的实用性。

现有技术中，对日常生活中的皮肤表面小创伤均用“创可贴”一类的消毒胶布。此类单一的贴胶仅能起到覆盖创面的作用，但不具备消炎和诱导上皮生长和促进创面快速愈合的优点。现有技术也用单一的或复合的抗菌素外用敷料治疗皮肤创伤，但这些敷料仅起到控制创面继发性细菌感染的作用，而不具有主动诱导皮肤上皮细胞在创面上快速生长、导致创面快速愈合的生物作用。本发明包含无机元素硅和/或钙的皮肤创面敷料可以多种方式使用，包括但不限于如下3种实施形式：

1) 以微颗粒散剂形式，直接应用于皮肤创面。微颗粒的组合按本发明中已设定的，以硅和钙微颗粒为各种单元素微颗粒，两种元素微颗粒的组合，或以各种单种元素混合后通过常规的物理或化学途径干化研磨所得复合元素微颗粒，并组合有制药学上可接受的载体、赋形剂和/或辅剂。

2) 以本发明中的硅和/或钙无机元素为生物诱导成分，加上传统的辅料如医用凡士林为基料，混合成软膏剂型用于皮肤创面。此基质起到保持创面被覆盖的同时，又起到载体的作用，携带上述的生物活性无机元素等有效成分，使有效成分较长久地附着于皮肤的创面而达到最佳的生物学效应。软膏中的生物诱导无机元素的有效成分含量按本发明中已设定的，硅的浓度为能使伤口创面组织的硅浓度上升至1 ppm - 100 ppm，钙的浓度为能使伤口创面组织的钙浓度上升至1 ppm - 33 ppm。

3) 以本发明中设定的硅和/或钙无机元素微颗粒为生物诱

导成分，用传统的胶贴纱布为基料，形成贴片型的皮肤创面敷料：此类贴片型皮肤创面敷料上的有效性硅和钙无机元素生物诱导成分为本发明中已设定的化学种类、组合比例和颗粒直径。本发明的贴片型皮肤创面敷料的面积为任何适合于人体各种皮肤创面覆盖的各种尺寸。

本发明的敷料材料可以有多种用途，例如用作各类体内植入器具(如冠状动脉金属支架等)的表面涂层。

在本发明的敷料材料中，也可不添加或添加任何剂量的各类传统的广谱或特异性的抗菌素，并包括不添加或添加任何剂量的各类传统的局部表面麻醉剂。

本发明的敷料材料中也可包含其它能促进上皮细胞增殖的因素，如纤维蛋白，上皮生长因子和/或人体生长因子，各类人体内提取的天然蛋白，各类中西药型的抗菌素和抑菌素，各类抗炎因子，各类自体或异体的同种皮肤材料，各类动物皮肤材料或提取物，各类金属和有机添加物，或者其任意组合。

本发明与现有技术相比具有的优点在于：由于应用具有人体上皮细胞诱导作用的硅和钙微颗粒作为敷料材料的主要“生物诱导活性物质”有效成分，本发明敷料材料的生物有效性明显优于现有技术中的不具生物诱导性的传统型“创口贴”或传统型抗菌素软膏；由于开创性地采用了无机元素为生物诱导成分，其生物稳定性和安全性明显优于现有技术中人工合成各类纤维蛋白或生长因子的使用；因为本发明的“生物诱导活性物质”的碱性特性，能有效地中和创面的酸性渗出物，创造一个有利于上皮细胞生长和创面快速愈合的局部环境。本发明中采用的无机元素活性物质具有的性能稳定和低价格等优点均明显优于现有技术的任何以生物蛋白作为活性成分的外用敷料。此外，本技术将无机活性物质与广谱抗菌素联合使用，可有效地防止皮肤创面的细菌性继发感染。

以保证硅钙无机活性元素对上皮细胞的诱导作用，使皮肤创面快速愈合。综合这些优点，本发明的敷料材料能主动地诱导上皮细胞增生，促进伤口快速愈合（缩短一半以上的时间）。创面的快速愈合，可免除或减少皮肤愈合后疤痕的形成。因此，本发明的敷料材料适用于大面积烧伤、化学性灼伤、褥疮和人体表面溃疡（如糖尿病患者的皮肤溃疡）、以及各类日常生活中的切割伤、跌伤、挫伤、烫伤等各种皮肤创面的治疗。

此类新型敷料材料具有开创性的生物主动诱导活性，并同时具有性能稳定、安全、经济、和应用方便的明显优点，可有效地和广泛地应用于从日常的切割伤、挫伤等小面积的创伤到大面积的烧伤、化学性灼伤、褥疮和人体表面溃疡（如糖尿病患者的皮肤溃疡）等各种皮肤创面，以促进伤口的快速愈合。

本发明的皮肤敷料材料的生物活性成分是一种不同于美国专利 6262020 公开的以透明质酸为主的外用药配方，区别在于本发明的生物活性成分同时具有控制炎症和促进上皮生长的作用，而透明质酸仅有控制皮肤创面炎性反应的单一作用。本发明的产品不同于美国专利 5190917, 5290762, 6262020 公开的丝氨酸酶抑制剂，此类酶抑制剂仅有抑制创面炎性反应的作用，但不拥有如本发明材料的生物诱导作用。本发明也不同于美国专利 5604200 公开的一种加入血浆纤维结合蛋白（plasma fibronectin）的外用创面敷料，此类敷料仅能在理论上具有促进人体细胞的附着作用，但在实际应用中，如从人体血浆中提取此类蛋白，则来源有限，价格昂贵，故难以在临幊上实施；如以体外基因工程途径获取此类蛋白，则基因合成的蛋白不具有与人体自然蛋白相似的生物学活性。所以，以生物活性蛋白作为常用外用药有效成分的理论并不具有临幊的实用价值。按以往的传统概念，所有无机元素的材料均是“惰性”材料，即不具有激发生物生长能力的材料。本发明

中的敷料材料采用的活性化学成分是一组无机元素材料，也是在国际上首次发现的具有上皮细胞生物诱导活性的无机元素。因为有了此一发现，无机元素组合可被开创性地取代以往只能通过生物诱导蛋白才能达到的上皮细胞生长的诱导促进作用。同时这组无机元素又具有消炎作用和理想的生物稳定性，从而解决了现有技术中存在的问题，从而形成一类兼有消炎、抑菌、促进上皮细胞增殖和创面修复的表面敷料材料，用于各种日常的切割伤，挫伤，烧伤，和化学性灼伤等的治疗。

在本发明中，除非另有说明，“生物诱导活性物质”定义为具有主动激发正常细胞增殖与特异性分化而达到特定生理功能的物质。本发明中的硅和钙无机元素具有主动激发正常人上皮细胞增殖与促进上皮细胞特异性生理功能（如第4型胶原纤维蛋白和上皮生长因子的合成功能）的生物诱导活性。第4型胶原纤维蛋白和上皮生长因子的合成功能在上皮细胞的快速增殖和皮肤创面的快速修复中起重要作用。现有技术的皮肤创面敷料产品均不具有类似本发明敷料材料的特异性生物诱导功能。本发明中的“生物诱导活性物质”又被进一步定为无机元素硅和钙。

本发明还提供了一种体外促进上皮细胞增殖的方法，包括对这样的细胞施用有效量的本发明硅和/或钙微颗粒物质。在一个实施方案中，所述微颗粒是可溶解性的，例如直径为100nm-100μm。它们可以是任何无机硅、钙物质形式，包括 SiO_2 、 NaAlSiO_2 、 KAlSiO_2 、 CaO 、 CaSO_4 、 CaPO_4 、 CaCl_2 等或者其任意组合。在一个实施方案中，所述硅和钙微颗粒组合使用，以相对化学原子量百分比计，硅的含量为50-100%，钙的含量为0%-50%。对于硅而言，其终浓度可以是例如1-100ppm。对于钙而言，其使用终浓度可以是例如1-33ppm。

下面结合附图以非限制性实施例的方式对本发明进行详细论

述。

实施例 1 混合型生物诱导硅钙微颗粒的制备

本发明中的硅和钙微颗粒直径采用混合型的形态组合，此为硅和钙微颗粒的实施例。其硅和钙微颗粒的直径为 100 纳米和 100 微米之范围，但本发明技术不局限于此范围。采用原料为氧化硅 (SiO_2) 和氧化钙 (CaO)，原材料重量比例为氧化硅 60%，氧化钙 40%。制备工艺步骤为，上述硅和钙无机原料颗粒按重量比例混合后置于 Retsch 轨道式自滚动碾磨机碾磨 1 至 3 天不等，再经精密筛网过滤选取直径为 100 纳米至 100 微米的大小不等的各类微颗粒，并按颗粒大小比例混合。微颗粒直径经电子扫描显微镜测量确认。图 1 显示了如此制备的硅、钙微颗粒敷料材料的电子扫描显微镜照片。此类混合型硅钙微颗粒经蒸汽高压消毒后，用于其后实施例的细胞学测试和临床病例应用。

实施例 2 正常人上皮细胞在硅和钙微颗粒诱导下的增殖与移行生长（附图 2）

测试之人体上皮细胞取之于年龄 20-25 岁的健康捐献者的皮肤组织。上皮组织在用无菌生理盐水清洗后，置于细胞培养皿中，加入含 10% 小牛血清和 0.2% 广谱抗菌素的常规细胞培养液中，置于 5% CO_2 和 37 摄氏度的温箱中培养，每天换一次新鲜培养液。在培养第 14 天，上皮细胞从组织中移行至培养皿平面上，此时移除组织，让衍生出的上皮细胞继续在培养皿上增殖。当细胞增殖至第 3 代和足够细胞数时，用 10% 纤维蛋白酶将细胞从培养皿上酶解下，用于实验。实验中，细胞种植到 2 厘米直径的常规培养皿上，培养液中除加入 10% 小牛血清和广谱抗菌素外，还加入按照实施例 1 制备的硅钙无机元素微颗粒。培养过程中，每隔 3 天，

更换一次含有相同特定化学浓度的新鲜培养液，然后在这些实施例中描述的时间内测试细胞的相关生理功能。本实施例的图片中显示在细胞培养第二天时，上皮细胞呈明显的增殖，伸展和移行。

实施例 3 硅和钙微颗粒对正常人上皮细胞的增殖有明显的诱导作用（附图 3）

上皮的早期快速增殖是上皮创面快速愈合的必要条件。本测试中用于鉴定测试材料的上皮细胞取之于正常人皮肤，按照实施例 2 所述方法，细胞在添加了本发明设定的硅和钙微颗粒材料的溶液中培养生长。本测试的细胞培养液预先添加了如图 3 表下方所示的特定化学成分组合和作用浓度。其中一组为不添加本发明硅钙微颗粒材料的对照组，添加了测试材料的实验组以此为对照组进行比较，从而判断测试材料对细胞生长的诱导作用。培养过程中，每隔 3 天，替换一次含有相同特定化学浓度的新鲜培养液。在培养的第 12 天和第 20 天时做细胞增殖的测试。测试以常规的细胞流动计数机对各种不同化学添加物浓度和组合中生长的细胞总数作计数，并以培养最初 24 小时附着于培养皿上的细胞数为基数，计算出附图所示的上皮细胞的增殖数值。测试证明，无机元素硅具有明显的诱导上皮细胞增殖的功能。与对照组相比，在培养第 12 天（图 3a），100 ppm 硅能导致近 3 倍的增殖，50 ppm 硅能导致近 2.5 倍的增殖，10 ppm 硅能导致近 1.5 倍的增殖。33 ppm 钙能导致近 1.5 倍的增殖，16 及 8 ppm 钙也能导致明显的增殖。同时，当硅和钙两种无机元素按图中所示的各种组合浓度比例添加入细胞培养液时，细胞的增殖率与对照组相比分别增加了 4.5 倍，3.5 倍和 2 倍。在培养第 20 天（图 3b），由于测试材料的持续诱导作用，100 ppm 硅维持了 3 倍的细胞增殖诱导作用，100 ppm 硅与 33 ppm 钙的组合导致了 5 倍以上的细胞增殖诱导作用。从不同的培养时间段与各组化学成分组合的结果看，硅与

钙在本测试的浓度和组合范围内具有其浓度与细胞增殖诱导作用成正比的明显现象，从而证明了无机元素硅和钙具有明显的上皮细胞增殖诱导作用。

实施例 4 硅和钙微颗粒对正常人上皮细胞第 4 型胶原纤维蛋白的合成与分泌有明显的诱导作用（附图 4）

第 4 型原原纤维蛋白是上皮中的主要间质蛋白之一，其合成与分泌是正常人上皮细胞的一项重要的特有的活性指标，在上皮创面的愈合中起重要作用。第 4 型胶原纤维蛋白合成和分泌的增加会有利于上皮创面的快速愈合。本测试中实验组与对照组的正常上皮细胞培养方法和条件与实施例 3 相同，不同的是在培养的第 12 天和第 20 天时对培养上皮细胞的第 4 型胶原纤维蛋白的合成与分泌进行定量测试。本测试利用抗人第 4 型胶原纤维蛋白的单克隆抗体(购自 Sigma 公司)，应用常规的免疫组织化学测试法，对分泌入各组细胞的细胞培养液中的第 4 型纤维蛋白作含量测定。数据为每千万个细胞在第 12 天和 20 天时分泌的第 4 型胶原纤维蛋白的纳微克数。测试证明，无机元素硅具有明显的诱导第 4 型胶原纤维蛋白合成分泌的功能。与对照组相比，在培养第 12 天，100 ppm 硅能导致 1 倍的增加，50 与 10 ppm 硅也能导致明显的增加。33 ppm 钙能导致近 0.5 倍的增加，16 及 8 ppm 钙也导致明显的增加。同时，当硅和钙两种无机元素按图中所示的各种组合浓度比例添加入细胞培养液时，第 4 型胶原纤维蛋白合成分泌的功能与对照组相比分别增加了 2 倍，1.5 倍和 1 倍。在培养第 20 天，由于测试材料的持续诱导作用，100 ppm 硅增加了 4 倍的第 4 型胶原纤维蛋白合成分泌，100 ppm 硅与 33 ppm 钙的组合导致了 6 倍以上的诱导作用。从不同的培养时间段与各组化学成分组合的结果看，硅与钙在本测试的浓度和组合范围内具有其

浓度与第 4 型胶原纤维蛋白合成分泌的诱导作用成正比的明显现象，从而证明了无机元素硅和钙具有明显的上皮细胞合成和分泌第 4 型胶原纤维蛋白的诱导作用。持久与逐渐增加的第 4 型胶原纤维蛋白水平有利于创面的纤维支架构建，从而促进创面的愈合。

实施例 5 硅和钙微颗粒对正常人上皮细胞上皮生长因子的合成与分泌有明显的诱导作用（附图 5）

上皮生长因子是上皮细胞增殖的主要调节蛋白之一，其合成与分泌是正常人上皮细胞的一项重要的特有的活性指标，在上皮创面的愈合中起重要作用。上皮生长因子合成和分泌的增加会有利于上皮细胞的快速增殖和创面的快速愈合。本测试中实验组与对照组的正常上皮细胞培养方法和条件与实施例 4 相同，不同的是在培养的第 12 天和第 20 天时对培养上皮细胞的上皮生长因子的合成与分泌进行定量测试。本测试利用抗人体上皮生长因子的单克隆抗体(购自 Sigma 公司)，应用常规的免疫组织化学测试法，对分泌入各组细胞的细胞培养液中的上皮生长因子作含量测定。数据为每千万个细胞在第 12 天和 20 天时分泌的上皮生长因子的纳微克数。测试证明，无机元素硅具有明显的诱导上皮生长因子合成分泌的功能。与对照组相比，在培养第 12 天，100 ppm 硅能导致约 4.5 倍的增加，50 与 10 ppm 硅也能导致明显的增加。33 ppm 钙能导致约 1.5 倍的增加，16 ppm 钙也导致明显的增加。同时，当硅和钙两种无机元素按图中所示的各种组合浓度比例添加入细胞培养液时，上皮生长因子合成分泌的功能与对照组相比分别增加了 6.5 倍，3.5 倍和 2.5 倍。在培养第 20 天，由于测试材料的持续诱导作用，100 ppm 硅增加了 1 倍的上皮生长因子合成分泌，100 ppm 硅与 33 ppm 钙的组合导致了近 3 倍的诱导作用。从不同的培养时间段与各组化学成分组合的结果看，硅与钙在本

测试的浓度和组合范围内具有其浓度与上皮生长因子合成分泌的诱导作用成正比的明显现象，从而证明了无机元素硅和钙具有明显的上皮细胞合成和分泌上皮生长因子的诱导作用。尤其是在培养早期，测试材料所造成的大幅度增加的上皮生长因子合成分泌可为上皮创伤的早期带来极大细胞增殖扩增效应，有力地促进创面的快速愈合。

实施例 6 硅和钙微颗粒新型敷料材料促进人体皮肤创面快速愈合的临床实例（附图 6）

本实施例展示应用硅和钙微颗粒新型敷料材料促进人体皮肤创面快速愈合的临床效果。患者为 16 岁女孩，在游泳池边跌伤了左膝部，皮肤挫伤面积约 3×6 平方厘米，深度达真皮深层，表面渗出明显。创伤后即被用本发明实施例 1 中所示的硅和钙微颗粒新型敷料材料散剂喷撒于创面，再覆盖上消毒纱布。在治疗后 48 小时，创面的渗出完全消失，没有继发性的创面感染，上皮细胞已覆盖了大部分创面。治疗后第 7 天，创面已完全修复，皮肤表面平整，仅留存少量由于挫伤时渗血所造成血红素色素滞留。治疗后 4 星期复查，皮肤创面完全愈合，血红素色素滞留也基本消失，无明显色素沉着，无疤痕形成。图 6 显示了本发明新型敷料材料散剂处理后不同时间点的创面照片，右侧为放大照片。实施例证明，本发明的新型皮肤创面敷料材料的创面修复能力是极其明显的。如以传统的表面敷料治疗此类创面，表面渗出至少可持续 3 天以上，上皮覆盖创面至少需时 10 天以上，再加上传统表面敷料还难以控制创面的细菌性感染，而感染将使创面的修复更加迟缓。因此，本发明的敷料可缩短至少一半以上的创面愈合时间。因为迟缓的创面愈合是创面愈后形成疤痕的主要原因，所以，本发明的新型敷料加速创面的愈合，也能有效地免除创面愈

合后疤痕的形成。

很显然，可以不按照上文说明书和实施例中所作的特定描述实践本发明。

基于上述教导有可能对本发明作许多改变和改进，因此可以在本发明待批权利要求范围内，不必依照这些特定描述实践本发明。

所有出版物(包括专利、专利申请、期刊文章、实验室手册、书籍或其他文献)的全部公开内容均列为本文参考文献。

参考文献：

- Chou L, Firth JD, Uitto V-J, Brunette DM. (1995) Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin, mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *Journal of Cell Sciences.* 108:1563-1573.
- Chou L, Firth JD, Uitto V-J, Brunette DM. (1996) Effects of titanium on transcriptional and post-transcriptional regulation of fibronectin in human fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research.* 31:209-217.
- Chou L, Firth JD, Uitto V-J, Brunette DM. (1998) Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research.* 39:437-445.
- Chou L, Marek B, Wagner WR. (1999) Effects of hydroxyapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency, and proliferation in vitro. *Biomaterials.* 20:977-985.

美国专利 6262020, 2001 年 7 月 17 日

美国专利 5604200, 1997 年 2 月 18 日

* 注：CHOU L. 是本发明人的英文名字

权 利 要 求

1. 一种可用于治疗或缓解个体中需要促进上皮细胞增殖分化的疾病或状况的敷料材料，其中含有治疗有效量的无机元素硅和/或钙微颗粒，以及任选地医学上可接受的载体和/或赋形剂。
2. 权利要求 1 的敷料材料，其中含有无机元素硅和钙微颗粒。
3. 权利要求 1 的敷料材料，其中所述硅和/或钙微颗粒以单元素微颗粒或复合元素微颗粒形式存在。
4. 权利要求 1 的敷料材料，其中所述微颗粒是可溶解性的。
5. 权利要求 1 的敷料材料，其中所述微颗粒直径为 100nm-100μm。
6. 权利要求 1 的敷料材料，其中所述无机元素硅选自 SiO_2 、 NaAlSiO_2 、 KAlSiO_2 等任何含硅的化合物或者其任意组合。
7. 权利要求 1 的敷料材料，其中以相对化学原子量百分比计，硅的含量为 0 - 100%，钙的含量为 0% - 100%。
8. 权利要求 1 的敷料材料，其中无机元素钙以 CaO 、 CaSO_4 、 CaPO_4 、 CaCl_2 等任何含钙的化合物或者其任意组合的形式存在。
9. 权利要求 1 的敷料材料，其中还可添加入抗生素、常规局部表面麻醉药物、或其它能促进上皮细胞增殖的因素，如纤维蛋白和/或上皮生长因子，或者其任意组合。
10. 权利要求 1 的敷料材料，其以粉剂、软膏或贴剂形式存在。
11. 权利要求 1 的敷料材料，其为皮肤创面敷料，用于促进皮肤创面修复或愈合。
12. 权利要求 1 的敷料材料，其中所述疾病或状况是切割伤、挫伤、烧伤、烫伤、化学性灼伤、褥伤或各类皮肤表面溃疡等。
13. 权利要求 1 的敷料材料，其中所述个体是动物，特别是哺乳动物(如猿、牛、马、猪、绵羊、啮齿动物、山羊、狗、猫)，最优

选人。

14. 无机元素硅和/或钙在制备可用于治疗或缓解个体中需要促进上皮细胞增殖分化的疾病或状况的敷料材料中的用途。

15. 权利要求 14 的用途，其中所述敷料材料用作各类体内植入器具的表面涂层。

16. 权利要求 15 的用途，其中所述体内植入器具是冠状动脉金属支架。

17. 权利要求 14 的用途，其中所述疾病或状况是切割伤、挫伤、烧伤、烫伤、化学性灼伤、褥伤或各类皮肤表面溃疡等。

18. 权利要求 14 的用途，其中所述无机元素硅和/或钙为 100nm-100μm 的微颗粒。

19. 一种体外促进上皮的细胞增殖的方法，包括对这样的细胞施用增殖有效量的硅和/或钙微颗粒物质。

20. 权利要求 19 的方法，其中硅的使用终浓度为 1 - 100ppm.

21. 权利要求 19 的方法，其中钙的使用终浓度为 1 - 33ppm.

22. 权利要求 19 的方法，其中所述微颗粒直径为 100nm-100μm.

23. 权利要求 19 的方法，其中无机元素硅和/或钙是 SiO_2 、 NaAlSiO_2 、 KAlSiO_2 、 CaO 、 CaSO_4 、 CaPO_4 、 CaCl_2 等任何含硅和/或钙的化合物，或者其任意组合。

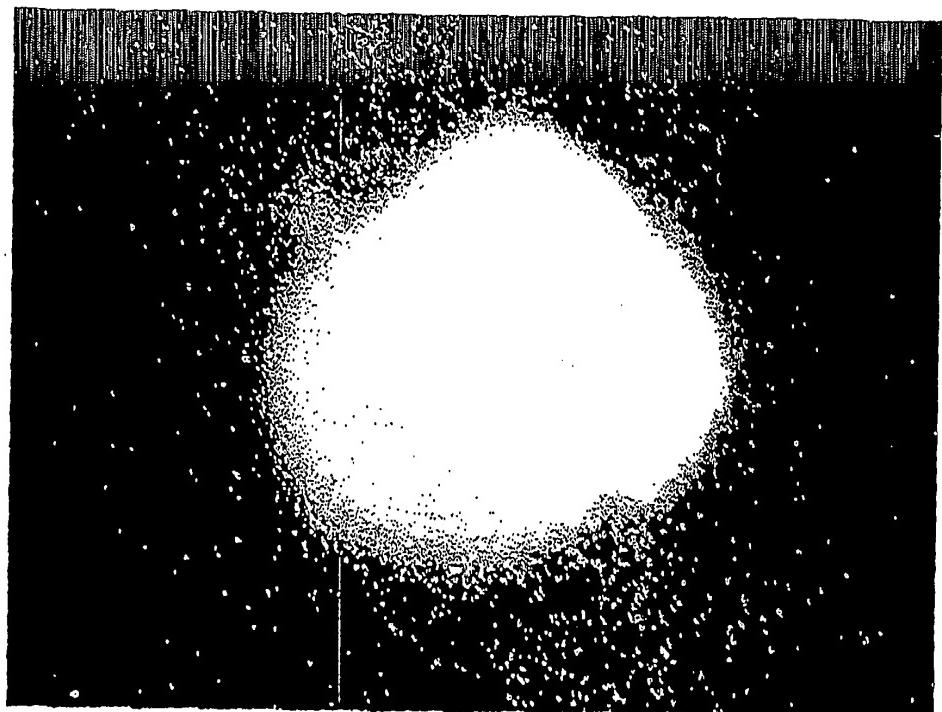


Fig. 1

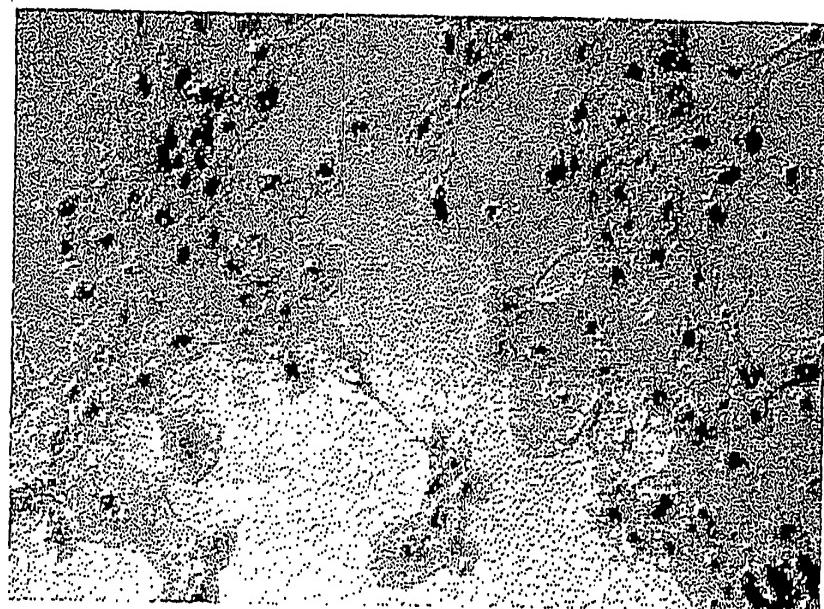
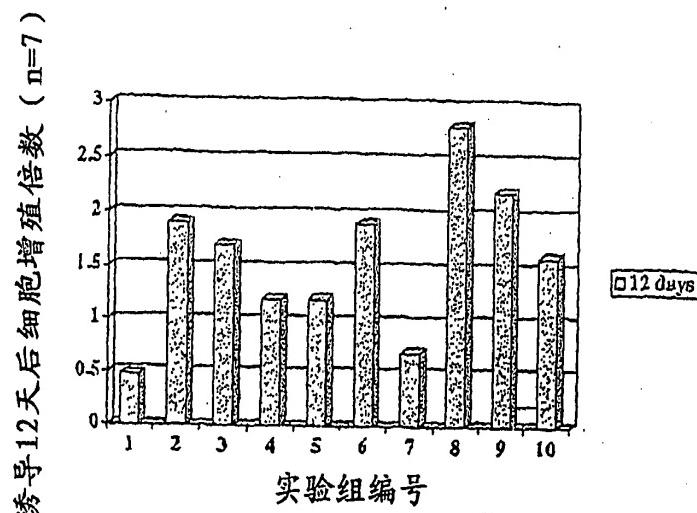
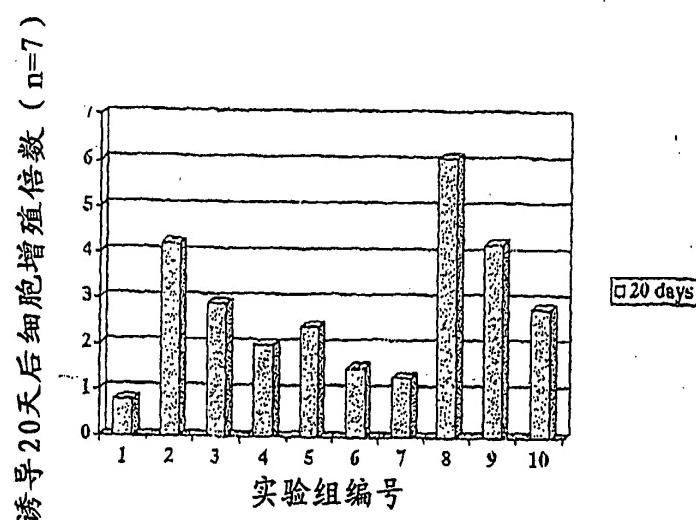


Fig. 2

组别:

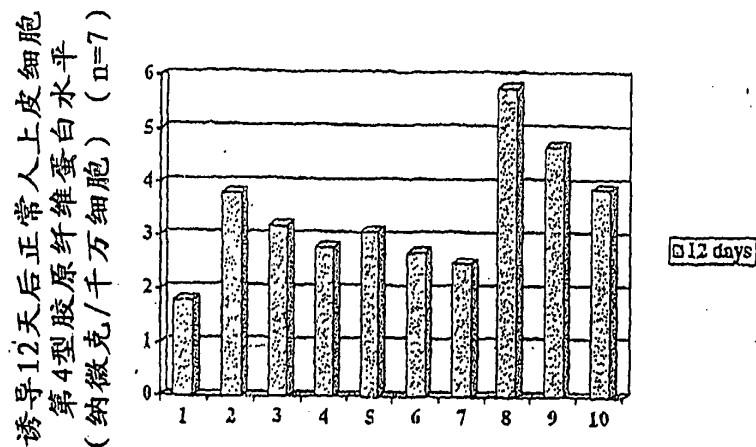
1. 对照组, 未添加任何实验元素。
2. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素。
3. 实验组, 添加 50 ppm 硅元素。
4. 实验组, 添加 10 ppm 硅元素。
5. 实验组, 添加 33 ppm 钙元素。
6. 实验组, 添加 16 ppm 钙元素。
7. 实验组, 添加 8 ppm 钙元素。
8. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素和 33 ppm 钙元素。
9. 实验组, 添加 50 ppm 硅元素和 16 ppm 钙元素。
10. 实验组, 添加 33 ppm 硅元素和 8 ppm 钙元素。

Fig. 3a

组别:

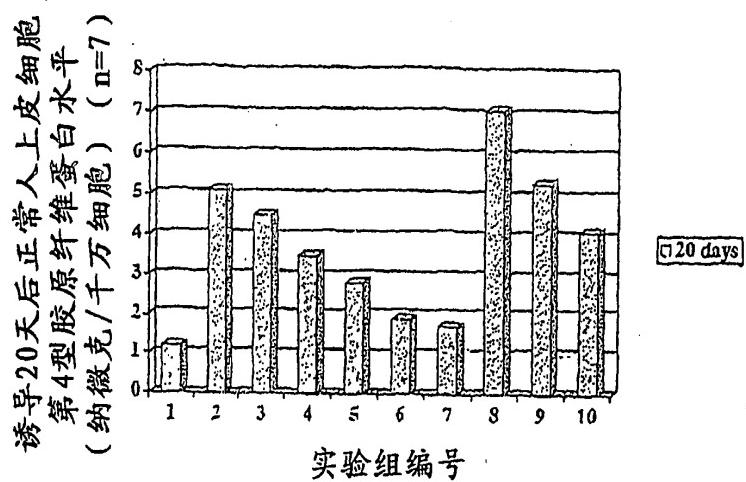
1. 空组, 未添加任何实验元素。
2. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素。
3. 实验组, 添加 50 ppm 硅元素。
4. 实验组, 添加 10 ppm 硅元素。
5. 实验组, 添加 33 ppm 钙元素。
6. 实验组, 添加 16 ppm 钠元素。
7. 实验组, 添加 8 ppm 钙元素。
8. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素和 33 ppm 钙元素。
9. 实验组, 添加 50 ppm 硅元素和 16 ppm 钙元素。
10. 实验组, 添加 33 ppm 硅元素和 8 ppm 钙元素。

Fig. 3b

组别:

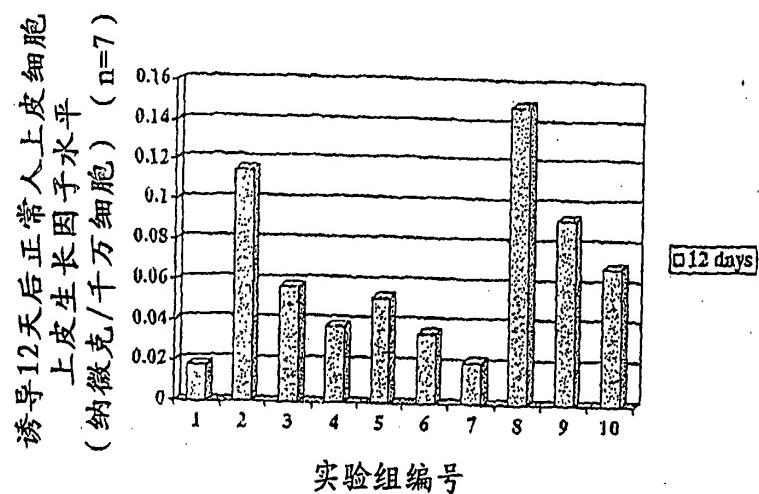
1. 对照组, 未添加任何实验元素。
2. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素。
3. 实验组, 添加 50 ppm 钙元素。
4. 实验组, 添加 10 ppm 硅元素。
5. 实验组, 添加 33 ppm 钙元素。
6. 实验组, 添加 16 ppm 钙元素。
7. 实验组, 添加 8 ppm 钙元素。
8. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素和 33 ppm 钙元素。
9. 实验组, 添加 50 ppm 硅元素和 16 ppm 钙元素。
10. 实验组, 添加 33 ppm 硅元素和 8 ppm 钙元素。

Fig. 4a

组别:

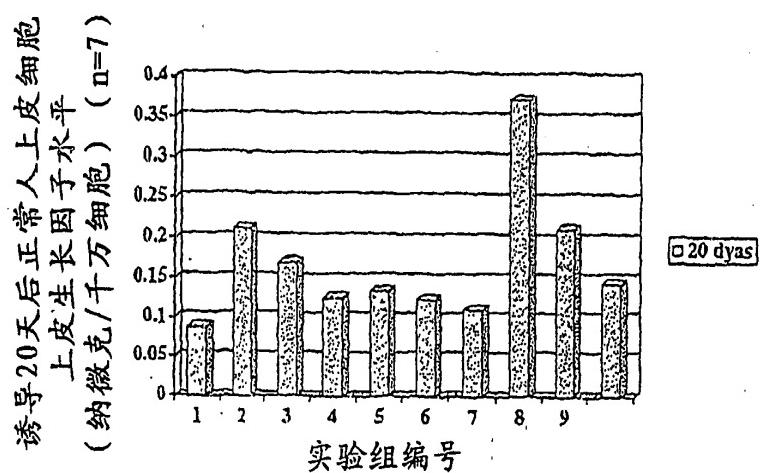
1. 对照组, 未添加任何实验元素。
2. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素。
3. 实验组, 添加 50 ppm 硅元素。
4. 实验组, 添加 10 ppm 硅元素。
5. 实验组, 添加 33 ppm 钙元素。
6. 实验组, 添加 16 ppm 钙元素。
7. 实验组, 添加 8 ppm 钙元素。
8. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素和 33 ppm 钙元素。
9. 实验组, 添加 50 ppm 硅元素和 16 ppm 钙元素。
10. 实验组, 添加 33 ppm 硅元素和 8 ppm 钙元素。

Fig. 4b

组别:

- 对照组, 未添加任何实验元素。
- 实验组, 添加 100 ppm 硅元素。
- 实验组, 添加 50 ppm 硅元素。
- 实验组, 添加 10 ppm 硅元素。
- 实验组, 添加 33 ppm 钙元素。
- 实验组, 添加 16 ppm 钙元素。
- 实验组, 添加 8 ppm 钙元素。
- 实验组, 添加 100 ppm 硅元素和 33 ppm 钙元素。
- 实验组, 添加 50 ppm 硅元素和 16 ppm 钙元素。
- 实验组, 添加 33 ppm 硅元素和 8 ppm 钙元素。

Fig. 5a

组别:

1. 对照组, 未添加任何实验元素。
2. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素。
3. 实验组, 添加 50 ppm 硅元素。
4. 实验组, 添加 10 ppm 硅元素。
5. 实验组, 添加 33 ppm 钙元素。
6. 实验组, 添加 16 ppm 钙元素。
7. 实验组, 添加 8 ppm 钙元素。
8. 实验组, 添加 100 ppm 硅元素和 33 ppm 钙元素。
9. 实验组, 添加 50 ppm 硅元素和 16 ppm 钙元素。
10. 实验组, 添加 33 ppm 硅元素和 8 ppm 钙元素。

Fig. 5b

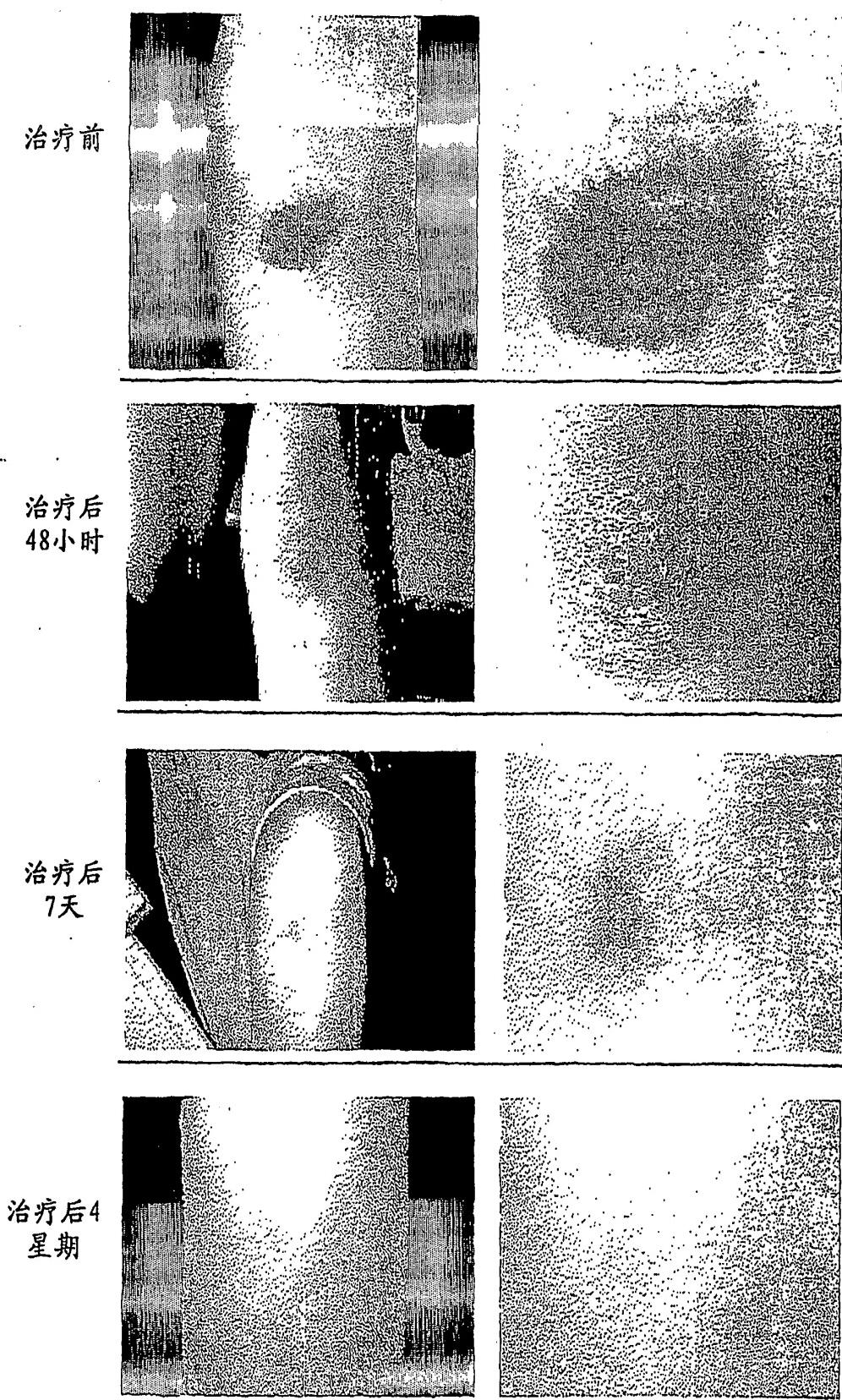


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ A61L15/18 A61K33/00 A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ A61L, A61F, A61M, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CN-PAT

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, CN-PAT, CNKI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US6268048B1 (K-C W et al.) 31.Jul.2004(31.07.2001), see page 2, column 3, lines 60-65; claims 14,18	1-14, 17-18
X	CN1209738A (STIE et al.) 03.Mar.1999(03.03.1999), see page 5, lines 15-20; claims 1-26	1-14, 17-18
A	US2002114826A1 (DRUR-I et al.) 22.Aug.2002(22.08.2002), whole document	1-23
A	US5503822A (SCHU-I) 02.April.1996 (02.04.1996), whole document	1-23
A	US4931274 A (PHYS-N) 05.Jun.1990 (05.06.1990), whole document	1-23

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25.Jun.2004

Date of mailing of the international search report

15 · JUL 2004 (15 · 07 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd, Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088,
China
Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Wenjuan Zhou

Telephone No. (86-01)62084837



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2004/000265

US6268048B1	31.07.2001	MX2001006602A1	01.12.2001
		WO0039218A2	06.07.2000
		AU200024021A	31.07.2000
CN1209738A	03.03.1999	MX9805515A1	01.06.1999
		WO9725022A1	17.07.1997
		ZA9700131A	23.09.1997
		AU1388797A	01.08.1997
		EP0873112A1	28.10.1998
		NZ325388A	28.02.2000
		AU717214B	23.03.2000
		US6086924A	11.07.2000
		KR99076983A	25.10.1999
		JP2000514039T	24.10.2000
US2002114826A1	22.08.2002	US6613347 B2	02.09.2003
		WO02068001A2	06.09.2002

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000265

A. 主题的分类

IPC⁷ A61L15/18 A61K33/00 A61P43/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁷ A61L, A61F, A61M, A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, PAJ: Si, silicate, silicon, Ca, calcium, dressing(s), skin, particle, particulate, granule, granular, granula, grain, epiderm+, epitheli+, coat, coats, coating, coatings

CN-PAT, CNKI: 硅, 钙, 皮肤, 敷料, 颗粒, 涂层, 上皮细胞, 上皮

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US6268048 B1 (K-C W 等) 2001 年 7 月 31 日 (31.07.2001), 参见权利要求 14, 18 和说明书第 3 栏 60-65 行	1-14, 17-18
X	CN1209738 A (STIE 等) 1999 年 3 月 3 日 (03.03.1999), 参见权利要求 1-26 和说明书第 5 页 15-20 行	1-14, 17-18
A	US2002114826 A1 (DRUR-I 等) 2002 年 8 月 22 日 (22.08.2002), 全文	1-23
A	US5503822A (SCHU-I) 1996 年 4 月 2 日 (02.04.1996), 全文	1-23
A	US4931274A (PHYS-N) 1990 年 6 月 5 日 (05.06.1990), 全文	1-23

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

25.6 月 2004 (25.06.2004)

国际检索报告邮寄日期

15 · 7 月 2004 (15 · 07 · 2004)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蔚菊桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

电话号码: (86-10)62084837



国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN 2004/000265

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US6268048B1	31.07.2001	MX2001006602A1 WO0039218A2 AU200024021A	01.12.2001 06.07.2000 31.07.2000
CN1209738A	03.03.1999	MX9805515A1 WO9725022A1 ZA9700131A AU1388797A EP0873112A1 NZ325388A AU717214B US6086924A KR99076983A JP2000514039T	01.06.1999 17.07.1997 23.09.1997 01.08.1997 28.10.1998 28.02.2000 23.03.2000 11.07.2000 25.10.1999 24.10.2000
US2002114826A	22.08.2002	US6613347 B2 WO02068001 A2	02.09.2003 06.09.2002